

## 加減攝營煎의 *Gardnerella vaginalis*에 대한 시험관내 항균력 및 Clindamycin과의 병용효과

대구한의대학교 부인과교실  
오자영, 김동철

### ABSTRACT

#### In Vitro Antibacterial Effects of *Gagam-seopyoungjeon* Aqueous Extracts and Their Combination Effects with Clindamycin against *Gardnerella Vaginalis*

Ja-Young Oh, Dong-Chul Kim

Dept. of Genecology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

**Objectives:** The object of this study was to observe the in vitro antibacterial effects of *Gagam-seopyoungjeon* aqueous extracts (GGSYJ) against *Gardnerella vaginalis* and the possible synergic combination effects with clindamycin.

**Methods:** Antibacterial activities against *Gardnerella vaginalis* of GGSYJ were detected using minimal inhibition concentration (MIC), and the effects on the bacterial growth curve were also monitored at MIC and MIC $\times$ 2 levels. The combination effects of GGSYJ with clindamycin were observed by checkboard microtiter assay, and the effects of bacterial growth curve treated with GGSYJ MIC+clindamycin MIC, 1/2 MIC and 1/4 MIC, respectively. The effects on the bacterial invasion and intracellular killing of GGSYJ were also observed using human vaginal epithelial (VK2) and murine macrophage (Raw264.7) cells with combination effects with clindamycin after treatment of GGSYJ MIC+clindamycin 1/2 MIC, 1/4 MIC and 1/6 MIC, respectively.

**Results:** The MIC of clindamycin and GGSYJ against *Gardnerella vaginalis* were detected as  $0.012\pm 0.006$  (0.004~0.016)  $\mu$ g/ml and  $1.016\pm 0.524$  (0.391~1.563) mg/ml, respectively. Clindamycin and GGSYJ were also showed marked dosage-dependent inhibition of bacterial growth, and significant decreases of viable cells were detected in clindamycin MIC+GGSYJ MIC and clindamycin 1/2 MIC+GGSYJ MIC treatment as compared with each of single clindamycin MIC and GGSYJ MIC treatments. And significant decreases of intraepithelial and intra-macrophage viable bacteria numbers were detected in clindamycin 1/2 MIC+GGSYJ 1/2 MIC and clindamycin 1/4 MIC+GGSYJ 1/2 MIC treatment as compared with each of single clindamycin GGSYJ 1/2 MIC treatments, respectively.

**Conclusions:** GGSYJ showed slight antibacterial effects against *Gardnerella vaginalis*, but they showed dosage-dependent inhibitory effects on the bacterial growth and VK2 epithelial invasions of bacteria with favorable accelerating effects of intracellular killing activities of macrophages. In addition, combination of GGSYJ also increased the inhibitory effects of clindamycin on the epithelial invasions of *Gardnerella vaginalis* and intracellular killing activities of macrophages against *Gardnerella vaginalis* as 2-fold higher as compared with clindamycin single treatment, respectively. Therefore, we expected that the clinical dosages of clindamycin can be reduced as 1/2 levels as combination with GGSYJ.

**Key Words:** *Gardnerella Vaginalis*, Vaginitis, *Gagam-seopyoungjeon*, Clindamycin, VK2 Cell

## I. 서 론

질염은 여성 생식기 감염 중 하나로써, 다양한 미생물에 의해 발생하며 원인에 따라 세균성 질증, 진균성, 원충성 및 바이러스성 질염으로 구분한다<sup>1)</sup>. 이 중 세균성 질증은 비특이성 질염 혹은 Gardnerella vaginitis로 알려져 있다. 이것은 정상 질 세균 군의 변형으로 과산화수소 생성 유산균이 감소되고 비호기성 균이 과증식되는 경우를 칭한다<sup>2)</sup>. 폐경기 여성을 제외한 여성에서 발생하는 질염의 90% 이상은 세균성 질증, 질 칸디다증, 트리코모나스 질염 등인데, 이 연령층에서 발생하는 질염 중에 가장 흔한 세균성 질증은 40~50%를 차지한다<sup>3)</sup>.

세균성 질증을 나타내는 여성 중 98% 이상에서 Gardnerella vaginalis가 발견되고 있는데<sup>1)</sup>, 이는 저체중아, 조숙아 출산을 2배로 증가시키고<sup>4)</sup>, human immunodeficiency virus(HIV)의 발현을 자극하며<sup>5)</sup>, 양막염, 제왕절개술 후 자궁내막염, 유산 후 골반염, 자궁 적출술 후 봉와직염 등의 발생빈도를 증가시키는 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>.

세균성 질증의 치료는 일반적으로 metronidazole을 경구 투여하거나 clindamycin을 질 내 주입하는 방법을 주로 사용하고 있으나<sup>7)</sup>, 이 약제에 내성을 가진 균이 등장하고, 오심, 구토, 복통 및 위경련, 피부 소양증, 접촉성 피부염 등의 부작용이 발생하며<sup>8)</sup> 만성적으로 재발한다는 문제점으로 인해 보다 효과적이고 안전한 치료법이 필요한 상황이다<sup>9)</sup>.

한의학에서 세균성 질증은 증상에 따라 帶下, 陰痒 등의 범주에 속하며<sup>10)</sup>, 병

인으로는 濕熱下注, 濕毒, 心肝火鬱, 濕熱下注, 脾腎陽虛, 肝腎陰虛 등으로 분류되고 있다<sup>2)</sup>.

加減攝營煎은 《晴崗醫鑑》<sup>11)</sup>에 수록된 처방으로, 胞宮이 虛寒하여 白色帶下가 暴下하며 氣血損耗하여 貧血, 眩暈하는데 쓰여왔으며, 貧血性慢性帶下 또는 長期下血하거나 특히 胃腸이 虛弱하여 攝取不良한 경우에 많이 쓰인 처방이다<sup>12)</sup>. 加減攝營煎은 부인과 질환 특히 虛症 帶下에 두루 사용되고 있으나, 아직까지 加減攝營煎의 세균성 질증에 대한 본격적인 연구는 보고된 바 없다.

이에 본 연구에서는 Gardnerella vaginalis 세균주를 이용하여 加減攝營煎 물 추출물의 항균력을 평가하였으며, clindamycin과의 병용효과 및 상피세포내 Gardnerella vaginalis 침투율 및 탐식 세포 내 사멸효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 약재 및 균주

본 실험에 사용된 약재는 대원약업사(Daegu, Korea)에서 매입한 것을 현미경하에서 관능검사를 통하여 선정하여 사용하였고, Gardnerella vaginalis는 American Type Culture Collection Center(VA, USA)에서 동결건조 상태로 구입하였다.

#### 2) 시약 및 기기

배지 및 시약으로 사용된 Brain Heart Infusion(BHI), Muller Hilton(MH) agar 또는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)/F12, 말 혈청(heat inactivated

horse serum), RPMI 1640 배지는 Difco Lab.(MI, USA)에서 modified BHI agar는 Junsei chemical Co.(Tokyo, Japan)에서 각각 구입하였고, 대조약물인 Clindamycin 및 이외 시약은 Sigma Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

실험에 사용한 기기는 96 well microtiter plate(Greiner, Frickenhausen, Germany), rotary vacuum evaporator(Eyela N-1110, Tokyo, Japan), programmable freeze dryer (Operon FDB-5503, Kimpo, Korea), spectrophotometer(Milton Roy Spectronic 20D: Milton Roy Company, Ivyland, PA, USA) 등을 사용하였다.

## 2. 방 법

### 1) 실험액 제조

본 실험에 사용된 1첩 분량의 조성은 다음과 같다(Table 1). 선정된 약재 각 0.5첩 분량 36.50 g을 취하여, 정제수 500 ml로 가열 추출한 후, 흡인 여과한 여과액을 rotary vacuum evaporater로 감압·농축하여 점 조성의 추출물을 얻은 다음 programmable freeze dryer를 사용하여 동결 건조시켜, 연갈색의 加減攝營煎 물 추출물 5.06 g(수율: 13.86%)을 얻어 실험에 사용하였다. 준비한 加減攝營煎 물 추출물은 -20℃의 냉장고에 보관 후 실험에 사용하였으며, 구입한 clindamycin은 4℃의 냉장고에 보관한 후 사용하였다. 加減攝營煎 물 추출물은 사용한 용매인 증류수에 25 mg/ml의 농도까지 비교적 잘 용해되었고, clindamycin은 0.128 µg/ml까지 비교적 잘 용해되었다.

Table 1. Composition of *Gagam-seopyoungjeon* Used in This Study

Herbs	Scientific name	Amount (g)
白芍藥	<i>Paeonia lactiflora</i> Pall.	8.00
白朮	<i>Atractylodes ovata</i> (Thunb.) DC.	8.00
山藥(炒)	<i>Dioscorea batatas</i> Decne	8.00
蓮子肉	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertner	8.00
酸棗仁(炒)	<i>Zizyphus jujuba</i> Mill	6.00
續斷(炒)	<i>Dipsacus asper</i> Wall	6.00
地榆	<i>Sanguisorba officinalis</i> L.	6.00
當歸	<i>Angelica gigas</i> N.	6.00
乾薑(炒黑)	<i>Zingiber officinale</i> Rosc.	4.00
川芎	<i>Ligusticum chuanxiong</i> Hort	4.00
白茯苓	<i>Poria cocos</i> (Schw.) Wolf	4.00
烏梅	<i>Prunus mume</i> Sieb. et Zucc.	3.00
炙甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	2.00
Total		73.00

### 2) 균주 및 배지

*Gardnerella vaginalis*를 modified BHI 배지에 녹인 후 modified BHI agar에 2~3 회 계대 배양한 후 사용하였다. Modified

BHI media는 김 등<sup>9)</sup>의 방법에 따라, 3.7%의 BHI powder와 20% 말의 혈청을 포함하며, 10% NaOH로 최종 pH를 7.4로 설정하였다. 이때 열처리된 말의

혈청은 BHI 용액과 별도로 멸균하여 혼합하였다. Modified BHI agar는 상기한 Modified BHI media 이외에 1.5% agar를 추가하여 제조한 후 87×15 mm의 조직배양접시에 평판배지로 만들어 사용 직전까지 4℃ 냉장 보관 후 사용하였다.

### 3) 균 수의 측정

정확한 흡광도(OD)와 세균 수의 상관관계를 알아보기 위하여 정량 평판법(Quantitative Plating Methods, Standard Plate Count)을 이용하여 균 수를 측정하였다<sup>13)</sup>. Gardnerella vaginalis를 spectrophotometer를 이용하여, 600 nm에서의 흡광도를 Mcfarland 0.5 standard와 같은 탁도로 조정된 다음 균액을 10, 100, 1000 및 10000배로 단계 희석하여 균의 농도가  $1 \times 10^4$  CFU/ml이 되도록 만들어 modified BHI agar에 접종하여, 37℃, 10% CO<sub>2</sub> 조건에서 24시간 배양한 다음 조직배양접시에 형성된 집락수를 희석된 순서대로 OD와 비교하였다. 0.5 Mcfarland standard 탁도는 1.175% barium chloride dihydrate(BaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) 0.05 ml과 1% sulfuric acid(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 9.95 ml를 혼합하여 준비하였다<sup>14)</sup>.

### 4) 항균활성도(MIC) 측정

加減攝營煎 물 추출물의 Gardnerella vaginalis에 대한 최소저지농도(MIC)를 표준 액체배지 희석법<sup>15)</sup>을 이용하여 측정하였다. 즉, 加減攝營煎 물 추출물을 25 mg/ml의 농도로 멸균증류수에 용해시킨 다음 계단식으로 배수 희석하여, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.782, 0.391, 0.195, 0.098 및 0 mg/ml의 총 10가지 농도를 준비하고, 각각 멸균된 96 well plate에 100 μl씩 분주한 다음, Gardnerella vaginalis의 단일 집락을 modified BHI 액체배지에 접종한 지 48시간 후 OD<sub>600</sub>을 spectrophotometer

로 측정하여,  $2 \times 10^6$  cell이 들어가도록 준비한 cell suspension 100 μl를 분주하였다. 이후 37℃, 10% CO<sub>2</sub> 조건에서 48시간 배양하였다.

Clindamycin 역시 0.128 μg/ml의 농도로 멸균증류수에 용해시킨 다음 계단식으로 배수 희석하여 0.064, 0.032, 0.016, 0.008, 0.004, 0.002, 0.001, 0.0005 및 0 μg/ml의 총 10가지 농도를 준비하고 동일한 방법으로 cell suspension( $2 \times 10^6$  cell)을 첨가한 다음 48시간 동안 37℃, 10% CO<sub>2</sub> 조건하에 배양하였다. Pfaller 등<sup>16)</sup>의 방법에 따라 MIC는 각각의 growth control well과 시료가 함유된 well의 Gardnerella vaginalis의 생장을 육안적으로 비교 관찰하여 균의 성장 억제제가 나타나는 최소 농도로 결정하였다. 모든 실험은 5회 반복하였다.

### 5) 시간대별 Gardnerella vaginalis 생장곡선

각각 단일 물질의 균 생장 저해능을 평가하기 위해 Janssen 등<sup>17)</sup>의 방법에 따라 Modified BHI 액체 배지에 Gardnerella vaginalis를 접종한 후 OD<sub>600</sub>을 spectrophotometer로 측정하여, Mcfarland 0.5 standard( $1.5 \times 10^8$  CFU/ml)로 각 균의 탁도를 조절한 다음 100배 희석하였다.

加減攝營煎(1.016 및 2.032 mg/ml)물 추출물 및 clindamycin(0.01 및 0.02 μg/ml)을 각각 MIC 및 MIC×2 농도로 준비한 cell suspension과 혼합한 다음 37℃, 10% CO<sub>2</sub> 조건하에 배양하면서 24, 48, 72, 96 및 120시간마다 OD를 측정하여, 시료를 첨가하지 않은 각각의 대조군과 실험군에서의 균 생장 억제를 비교하였다. 모든 실험은 5회 반복하였다.

Clindamycin과 加減攝營煎 물 추출물의 균 생장에 미치는 병용효과를 평가하기 위

해 동일한 방법으로 준비된 cell suspension에 clindamycin MIC(0.01 µg/ml), 加減攝營煎 물 추출물 MIC(1.016 mg/ml), clindamycin MIC+加減攝營煎 물 추출물 MIC, clindamycin 1/2 MIC(0.005 µg/ml)+加減攝營煎 물 추출물 MIC 및 clindamycin 1/4 MIC(0.0025 µg/ml)+加減攝營煎 물 추출물 MIC농도를 첨가한 다음 37°C, 10% CO<sub>2</sub> 조건하에 배양하면서 24, 48, 72, 96 및 120시간 마다 OD를 측정하여, 시료를 첨가하지 않은 각각의 대조군과 실험군에서의 균 성장 억제를 비교하였다. 모든 실험은 5회 반복하였다.

#### 6) Checkerboard Microtiter Assay

Checkerboard microtiter assay<sup>18,19)</sup>법을 이용해 加減攝營煎 물 추출물과 Clindamycin의 병용에 따른 효과를 관찰하였다. Checkerboard 검사는 96 well microtiter plate에 modified BHI 배지에 혼합된 균액 140 µl와 시험할 두 가지 물질을 30 µl씩 각각 첨가하였고, 균액은 0.5 Mcfarland 탁도의 균액을 희석하여, 최종 농도가 2×10<sup>6</sup> CFU/ml가 되게 하였다. 각 항균제 농도는 MIC의 0.06배부터 4배정도에서 2배씩 희석해, 96 well plate에 직각으로 분주하여, 100가지의 다양한 농도 조합이 이루어지도록 하였다. 이후 37°C, 10% CO<sub>2</sub> 조건하에 48시간 배양한 후 각 well의 균 성장을 육안적으로 판독하였다. 병합효과는 Isenberg 등<sup>18)</sup>과 윤 등<sup>19)</sup>의 방법들에 따라 Fractional inhibitory concentration (FIC) index를 다음과 같이 계산하여 평가하였다.

$$\text{FIC A} = (\text{MIC of Drug A in combination}) / (\text{MIC of Drug A alone})$$

$$\text{FIC B} = (\text{MIC of Drug B in combination}) / (\text{MIC of Drug B alone})$$

$$\text{FIC index} = \text{FIC A} + \text{FIC B}$$

[Drug A = Clindamycin; Drug B = GGSYJ aqueous extracts]

판독은 FIC index 0.5 이하일 경우 상승, 0.5에서 1 사이일 경우 부분상승, 1에서 4사이일 경우 무관, 4이상일 경우 길항으로 해석하였다<sup>19)</sup>. 모든 실험은 5회 반복하였다.

#### 7) 세포 내 세균 사멸효과 측정

Gardnerella에 대한 세포 내 세균 사멸효과는 Cuffini 등<sup>20)</sup>의 방법에 따라 murine macrophage 세포주인 Raw 264.7 세포를 이용하여 평가하였다. 즉, 24-well plate에 Raw 264.7세포를 배양한 4%의 heat-inactivated adult horse serum을 포함한 DMEM/F12 배지 1 ml를 분주한 다음 2×10<sup>7</sup> CFU/ml의 Gardnerella vaginalis를 첨가하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에 30분간 배양하여, 탐식을 촉진시켰다. 이후 Sub-MIC(1/2 MIC) 농도의 clindamycin (0.06 µg/ml)과 加減攝營煎 물 추출물 (0.508 mg/ml), 1/2 MIC농도의 clindamycin (0.06 µg/ml)+1/2 MIC농도의 加減攝營煎 물 추출물, 1/4 MIC농도의 clindamycin (0.03 µg/ml)+1/2 MIC농도의 加減攝營煎 물 추출물 또는 1/6 MIC농도의 clindamycin (0.0015 µg/ml)+1/2 MIC농도의 加減攝營煎 물 추출물을 각각 첨가하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에 6시간 배양한 다음 세포만 수집하여, PBS로 세척한 다음 5 µg/ml의 lysotaphin을 처리하여, 세포막 또는 세포 밖에 부착된 세균을 사멸시키고, Raw 264.7 세포들을 멸균 증류수로 용해시킨 다음 생균 수를 각각 측정하였다. 본 실험에서는 추출물을 처리하지 않은 배양 well을 대조군으로 사용하여, 세포 내 세균 사멸효과를 측정하였다.

### 8) 상피세포 내 세균 침투 저해효과 측정

Gardnerella vaginalis의 상피세포 내 침투 저해효과를 Almeida 등<sup>21)</sup>의 방법에 따라 사람정상 질상피세포 유래인 human vaginal epithelial(VK2) 세포를 이용하여 평가하였다. 즉, 24-well plate에 VK2 세포를 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에 5%의 FBS 및 1% 항진균제가 포함된 DMEM/F12 배지에 사용 전 20시간동안 배양하고 사용시 배양한 VK2세포(2×10<sup>4</sup> cells)를 멸균 PBS로 3회 반복 세척한 다음, 2×10<sup>9</sup> CFU/ml의 Gardnerella vaginalis가 포함된 DMEM/F12 배지 1 ml을 첨가하고, Sub-MIC(1/2 MIC)농도의 clindamycin (0.06 µg/ml)과 加減攝營煎 물 추출물 (0.508 µg/ml), 1/2 MIC농도의 clindamycin (0.06 µg/ml)+1/2 MIC농도의 加減攝營煎 물 추출물, 1/4 MIC농도의 clindamycin (0.03 µg/ml)+1/2 MIC농도의 加減攝營煎 물 추출물 또는 1/6 MIC농도의 clindamycin (0.0015 µg/ml)+1/2 MIC농도의 加減攝營煎 물 추출물을 각각 첨가한 다음 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 2시간 배양하여 세포의 세균을 제거하였다. 처리가 완료된 VK2세포를 다시 멸균 PBS로 3회 반복 세척한 다음 0.25% trypsin처리를 하여 부유시키고, 0.025%의 Triton X-100이 포함된 멸균 증류수로 세포를 용해시킨 다음 생균 수를 측정하였다. 본 실험에서는 5회 반복 실험을 실시하였으며, 추출물을 처리하지 않은 배양 well을 대조군으로 사용하여 상피세포 내 침투 저해효과를 평가하였다.

### 9) 통계 처리

모든 수치는 5회 반복실험의 Mean±SD로 표시하였으며, 균 생장 곡선, 세포 내

세균 사멸효과 및 상피세포 내 세균 침투 저해효과에 미치는 영향은 다중비교 검증을 이용하여 통계 처리를 실시하였고, 분산동질성을 Levene test를 실시하여 검증하였다. 등분산일 경우 one way ANOVA test를 실시한 다음 least-significant differences test로 사후 검증을 실시하여 군간의 유의성을 측정하였다. 비등분산일 경우에는 비모수 검증인 Kruskal-Wallis H test를 실시하여 유의성이 인정된 경우에는 Mann-Whitney U(MW) test를 실시하여 군 간의 유의성을 검증하였다. 모든 통계 처리는 SPSS for Windows (Release 14.0K, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하였으며, p-value가 0.05 이하인 경우 통계적 유의성을 인정하였다. 후보물질의 효과를 보다 명확히 하기 위하여, 처리군과 비처리 대조군과의 percent change를 아래의 공식을 이용하여 측정하였다.

Percentage Changes as Compared with Control(%) = {(Data of test material treated groups)-(Data of control)}/(Data of control) × 100

## III. 결 과

### 1. 항균활성도(MIC)

Clindamycin과 GGSYJ의 Gardnerella vaginalis에 대한 MIC를 표준 액체배지 희석법으로 평가한 결과 加減攝營煎 물 추출물의 MIC는 1.016±0.524(0.391~1.563) mg/ml이었고 clindamycin의 MIC는 0.012±0.006(0.004~0.016) µg/ml로 관찰되었다 (Table 2).

Table 2. Minimal Inhibition Concentration (MIC) against Gardnerella Vaginalis Detected in This Study by Agar Microdilution Method

Test materials	MIC	Ranges
Gagam-seopyo ungyeon (mg/ml)	1.016±0.524	0.391 ~ 1.563
Clindamycin (µg/ml)	0.012±0.006	0.004 ~ 0.016

2. 시간대별 Gardnerella vaginalis의 성장곡선

1) 加減攝營煎 물 추출물의 효과

배양 24시간 후부터 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01 또는 p<0.05) 용량 의존적인 균 수의 감소가 각각 인정되었다.

加減攝營煎 물 추출물 MIC 농도(1.016 mg/ml) 처리군의 생균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -18.55, -27.27, -25.37, -17.41 및 -17.60%의 변화를 나타내었다.

加減攝營煎 물 추출물 MIC×2 농도 처리군의 생균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -33.58, -43.22, -41.39, -38.16 및 -34.84%의 변화를 나타내었다(Fig. 1).

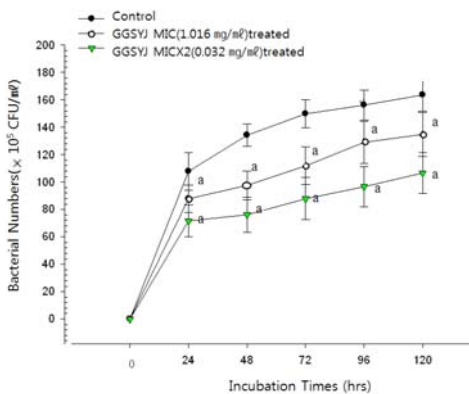


Fig. 1. Effects of Gagam-seopyoungjeon (GGSYJ) on the Growth of Gardnerella

Vaginalis with Incubation Times.

a : p<0.01 as compared with control by LSD test

2) Clindamycin의 효과

배양 24시간 후부터 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.01) 처리 용량 의존적인 균 수의 감소가 각각 인정되어 120시간 까지 지속되었다.

Clindamycin MIC 농도(0.01 µg/ml) 처리군의 생균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -43.59, -46.92, -48.82, -48.59 및 -47.82%의 변화를 나타내었다.

Clindamycin MIC×2 농도(0.02 µg/ml) 처리군의 생균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -49.27, -53.55, -54.77, -55.40 및 -56.30%의 변화를 나타내었다(Fig. 2).

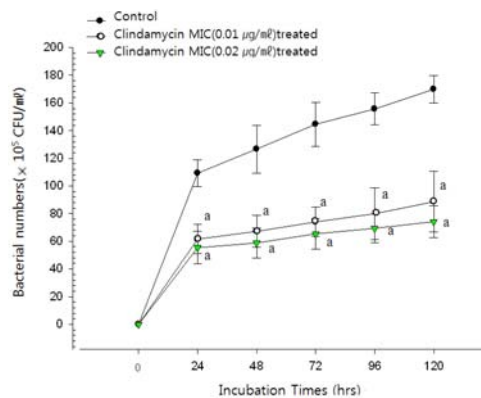


Fig. 2. Effects of Clindamycin on the Growth of Gardnerella Vaginalis with Incubation Times.

a : p<0.01 as compared with control by LSD test

3) Clindamycin과 加減攝營煎의 병용 효과

배양 24시간 후부터 clindamycin MIC 농도 처리군, 加減攝營煎 물 추출물 MIC

농도 처리군, clindamycin MIC+加減攝營煎 물 추출물 MIC 농도 병용 처리군, clindamycin 1/2 MIC+加減攝營煎 물 추출물 MIC 농도 병용 처리군 및 clindamycin 1/4 MIC+加減攝營煎 물 추출물 MIC 농도 병용 처리군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$ ) 처리 용량 의존적인 균수의 감소가 각각 인정되어, 120시간까지 지속되었다. 한편 각각의 clindamycin 및 加減攝營煎 물 추출물 MIC 농도 단독 처리군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$  또는  $p < 0.05$ ) 생균 수의 감소가 clindamycin MIC+加減攝營煎 물 추출물 MIC 및 clindamycin 1/2 MIC+加減攝營煎 물 추출물 MIC 농도 병용 처리군에서 각각 배양 24시간 후부터 인정되기 시작하여, 배양 120시간까지 지속적으로 관찰되었다. 한편 clindamycin 1/4 MIC+加減攝營煎 물 추출물 MIC 농도 병용 처리군에서는 加減攝營煎 물 추출물 MIC 농도 단독 처리군에 비해 유의성 있는( $p < 0.01$ ) 생균 수의 감소가 배양 24시간 후부터 인정되기 시작하여, 배양 120시간까지 지속적으로 관찰되었으나, clindamycin MIC 농도 단독 처리군에 비해서 유의성 있는 생균 수의 변화는 모든 배양 시간대에서 인정되지 않았다.

Clindamycin MIC 농도(0.01  $\mu\text{g/ml}$ ) 단독 처리군의 생균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -45.22, -45.87, -47.90, -46.15 및 -45.92%의 변화를 나타내었다.

加減攝營煎 물 추출물 MIC 농도(1.016 mg/ml) 단독 처리군의 생균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -21.51, -25.74, -23.81, -20.29 및 -20.46%의 변화를 나타내었다

Clindamycin MIC 농도(0.01  $\mu\text{g/ml}$ )+ 加減攝營煎 물 추출물 MIC 농도(1.016 mg/ml) 병용 처리군의 생균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -70.22, -73.01, -71.85, -66.31 및 -65.41%의 변화를 나타내었다.

Clindamycin 1/2 MIC 농도(0.005  $\mu\text{g/ml}$ ) + 加減攝營煎 물 추출물 MIC 농도(1.016 mg/ml) 병용 처리군의 생균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -63.05, -65.21, -64.29, -62.33 및 -61.27%의 변화를 나타내었다.

Clindamycin 1/4 MIC 농도(0.0025  $\mu\text{g/ml}$ ) + 加減攝營煎 물 추출물 MIC 농도(1.016 mg/ml) 병용 처리군의 생균 수는 배양 24, 48, 72, 96 및 120시간 후 대조군에 비해 각각 -49.82, -51.17, -51.54, -49.60 및 -48.48%의 변화를 나타내었다(Fig. 3).

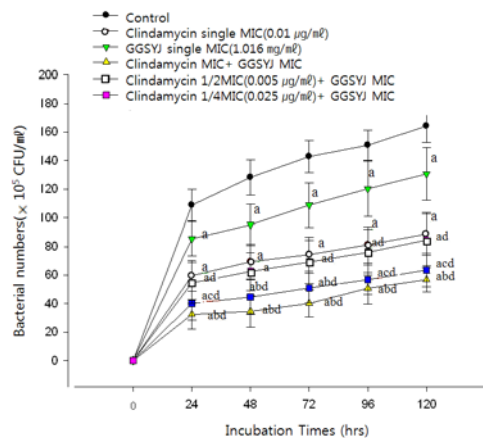


Fig. 3. Effects of *Gagam-seopyoungjeon* (GGSYJ) and Clindamycin Combination on the Growth of Gardnerella Vaginalis with Incubation Times.

a :  $p < 0.01$  as compared with control by LSD test

b :  $p < 0.01$  and c :  $p < 0.05$  as compared with clindamycin single treatment by LSD test

c :  $p < 0.01$  as compared with GGSYJ single treatment by LSD test



### 3. Checkerboard Microtiter Assay에 의한 병용효과

Gardnerella vaginalis에 대해 clindamycin 단독 처리시 MIC는 0.0112±0.0031 µg/ml 였으나, 加減攝營煎 물 추출물과 병용 처리시 0.0031±0.0030 µg/ml으로 낮아졌다.

加減攝營煎 물 추출물 단독 처리시 MIC는 0.938±0.529 mg/ml였으나, clindamycin 과 병용시 0.195±0.120 mg/ml로 낮아졌다. 따라서 FIC index는 0.544±0.231로 나와 부분 상승작용이 있는 것으로 나타났다 (Table 3).

Table 3. Activity of Clindamycin and *Gagam-seopyoungjeon* (GGSYJ) Combination on Gardnerella Vaginalis by Checkerboard Microtiter Assay

Test materials	Single treatment		Combination treatment		FIC index	
	MIC	Range	MIC	Range	FIC	Range
GGSYJ (mg/ml)	0.9380 ±0.5920	0.3910 ~1.5630	0.1950 ±0.1200	0.0980 ~0.3910	0.544 ±0.231	0.499 ~0.751
Clindamycin (µg/ml)	0.0112 ±0.0044	0.0080 ~0.0160	0.0031 ±0.0030	0.0005 ~0.0080		

### 4. 세포 내 세균 사멸효과

Murine macrophage 유래의 Raw 264.7 cell을 이용한 세포 내 Gardnerella vaginalis 에 대한 사멸효과를 평가한 결과, 각각 매체 처리 대조군에 비해 유의성 있는 탐식 세포 내 생균 수의 감소를 나타내었다.

한편 각각의 clindamycin 및 加減攝營煎 물 추출물 1/2 MIC 농도 단독 처리군에 비해 유의성 있는 탐식세포 내 생균 수의 감소가 clindamycin 1/2 MIC+加減攝營煎 물 추출물 1/2 MIC 및 clindamycin 1/4 MIC+加減攝營煎 물 추출물 1/2 MIC 농도 처리군에서 각각 인정되었다.

Raw 264.7 세포 내 생균 수는 1/2 MIC 농도의 clindamycin(0.06 µg/ml) 및 加減攝營煎 물 추출물(0.508 mg/ml) 단독 처리군, 1/2 MIC농도의 clindamycin+1/2 MIC 加減攝營煎 물 추출물 농도 병용 처리군, 1/4 MIC 농도의 clindmaycin+1/2 MIC 加減攝營煎 물 추출물 농도 병용 처리군 및 1/6 MIC 농도의 clindamycin

(0.0015 µg/ml)+1/2 MIC 加減攝營煎 물 추출물 농도의 병용 처리군에서 매체 대조군에 비해 각각 -69.53, -44.31, -89.48, -83.56 및 -64.86의 변화를 나타내었다 (Fig. 4).

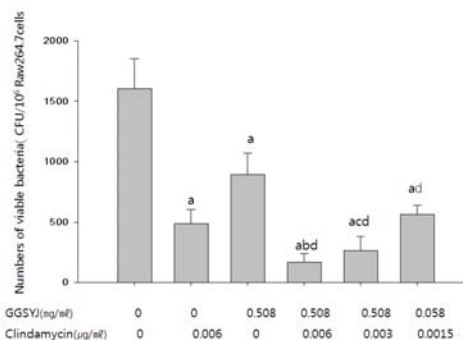


Fig. 4. Results of Intracellular Killing Assay against Gardnerella Vaginalis on Murine Macrophage Raw 264.7 Cells.  
 a : p<0.01 as compared with control by MW test  
 b : p<0.01 and c p<0.05 as compared with clindamycin single treatment by MW test  
 c : p<0.01 as compared with GGSYJ single treatment by MW test  
 GGSYJ : *Gagam-seopyoungjeon*

### 5. 상피세포 내 세균 침투 저해효과

사람 정상 질 상피세포 VK2세포를 이용하여, Gardnerella vaginalis의 상피세포 침투 저해 효과를 평가한 결과, sub-MIC농도의 clindamycin 및 加減攝營煎 물 추출물 단독 처리군, clindamycin 1/2 MIC+加減攝營煎 물 추출물 1/2 MIC 농도 병용 처리군, clindamycin 1/4 MIC +加減攝營煎 물 추출물 1/2 MIC 농도 병용 처리군 및 clindamycin 1/6 MIC+加減攝營煎 물 추출물 1/2 MIC 농도 병용 처리군에서 각각 매체 처리 대조군에 비해 유의성 있는 상피세포 내 세균 수의 감소를 나타내었다.

한편 각각의 clindamycin 및 加減攝營煎 물 추출물 1/2 MIC 농도 단독 처리군에 비해 유의성 있는 상피세포 내 세균 수의 감소가 clindamycin 1/2 MIC+加減攝營煎 물 추출물 1/2 MIC 및 clindamycin 1/4 MIC+加減攝營煎 물 추출물 1/2 MIC 농도 처리군에서 인정되었다.

VK2 세포 내 세균 수는 1/2 MIC 농도의 clindamycin(0.06 µg/ml) 및 加減攝營煎 물 추출물(0.508 mg/ml) 단독 처리군, 1/2 MIC 농도의 clindamycin+1/2 MIC 농도 加減攝營煎 물 추출물 병용처리군, 1/4 MIC 농도의 clindamycin+1/2 MIC 加減攝營煎 물 추출물 농도 병용처리군 및 1/6 MIC 농도의 clindamycin (0.0015 µg/ml)+1/2 MIC 加減攝營煎 물 추출물 농도 병용 처리군에서 대조군에 비해 각각 -63.41, -36.00, -85.94, -81.53 및 -41.00%의 변화를 나타내었다(Fig. 5).

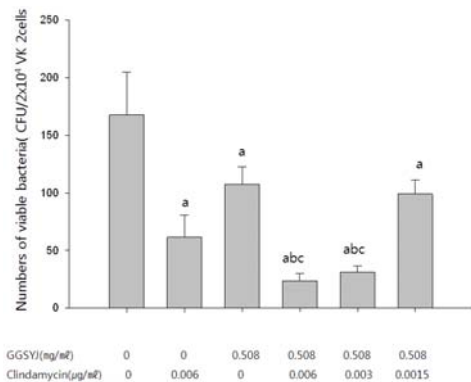


Fig. 5. Results of Bacterial Invasion Assay against Gardnerella Vaginalis on Human Normal Vaginal Epithelial Human Vaginal Epithelial (VK2) Cells.

a : p<0.01 as compared with control by MW test

b : p<0.01 as compared with Clindamycin single treatment by MW test

c : p<0.01 as compared with GGSYJ single treatment by MW test

GGSYJ : *Gagam-seopyoungjeon*

## IV. 고 찰

세균성 질증은 비염증성으로 질 내의 정상 세균총이 Gardnerella vaginalis, Mycoplasma hominis, 혐기성균 등으로 대체되어 발생한다. 또한, 질의 pH가 4.5 이상으로 증가하고, 질 상피세포 중 clue cell 이 20% 이상을 차지하며, 질분비물에 10% KOH를 첨가하면(whiff test) 독특한 amine 냄새가 나타나는 경우 진단된다<sup>2)</sup>.

세균성 질증에 대한 내복, 외용약이 많이 쓰여지고 있으나, 극부적인 pH의 변화, 질 내 정상 세균총의 교란 등과 같은 문제로 인하여 아직까지 안전한 치료제가 개발되지 않은 상태이다<sup>22,23)</sup>. 세균성 질증의 외용약으로 많이 사용되고 있는 clindamycin은 말라리아와 같은 원충 질환 및 혐기성세균 치료를 위해 개발된 lincomsamide 계열 항생제로, 현재 좌창

과 일부 methicilli 내성 황색 포도상구균 (MRSA) 감염증에 흔히 사용되고 있다<sup>24)</sup>. 그러나 Clindamycin의 일반적인 부작용으로 설사, 위막성 결장염, 오심, 구토, 복통, 복부 경련, 발진, 소양증 등이 있고<sup>8)</sup>, clindamycin에 내성을 나타내는 클로스트리듐 디피실리 균 증식에 의한 설사, 결장염, 독성 거대 결장증이 문제시되고 있다<sup>25)</sup>.

또한, Gardnerella vaginalis는 질 상피 세포 내 부착 및 침투성이 우수하고, 숙주의 면역반응을 회피하여 macrophage와 같은 탐식세포에 의해 제거되지 않아 재발을 반복하며, metranidazole과 같은 다양한 약물에 대해 저항성을 나타내므로 보다 항생제의 남용을 방지하고 효력을 높일 수 있는 방법의 개발이 필요하다<sup>26)</sup>.

한의학에서 帶下는 여성생식기 분비물의 총칭으로 세균성 질증은 帶下의 범주에 속하는데, 치료처방으로는 濕熱或濕毒帶下에 龍膽瀉肝湯, 芎柏樗根丸, 脾虛帶下에 完帶湯, 腎陰虛帶下에 知柏地黃湯, 腎陽虛帶下에 內補丸, 鹿角兎絲子丸 등을 사용한다<sup>2)</sup>. 加減攝營煎은 白芍藥, 白朮, 山藥(炒), 蓮子肉, 酸棗仁(炒), 續斷(炒), 地榆, 當歸, 乾薑, 川芎, 茯苓, 烏梅 및 甘草 등의 총 13가지 약재로 구성된 처방으로, 脾가 虛하여 血을 잘 통솔하지 못하여 생긴 증을 치료하고, 대체로 근심하고 성내고 오랫동안 과로하였거나 攻下제를 오용하여 脾陰을 상하여 中焦의 기가 허해졌을 때 사용되는 攝營煎의 변방이다<sup>27)</sup>. 이를 보아 脾虛帶下에 속한다고 볼 수 있고, 세균성 질증의 만성기에 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

세균성 질증의 한의학적 치료에 대한 연구로는 蛇床子洗方<sup>28)</sup>, 清帶湯<sup>29)</sup>, 完帶湯<sup>30)</sup> 등이 있었는데 아직까지 加減攝營煎에 대한 연구는 없었다. 또한, 구성 약물 중 白芍藥<sup>31)</sup>, 白朮<sup>32)</sup>, 山藥(炒)<sup>33)</sup>, 續斷(炒)<sup>34)</sup>, 地榆, 乾薑(炒黑), 川芎<sup>35,36)</sup>, 當歸<sup>37,38)</sup>, 烏梅 및 炙甘草<sup>39-41)</sup> 추출물의 다양한 항균활성작용에 대한 연구가 있으나 세균성 질염에 대한 본격적인 연구는 아직까지 보고된 바 없다.

근래에 들어 천연물과 항생제의 병용시 높은 상승효과가 초래되는 것으로 알려져 있으며<sup>42-44)</sup>, 이에 본 연구는 세균성 질증의 치료에 대표적이나 부작용이 심각한 항생제인 clindamycin과 加減攝營煎 물 추출물의 병용시 항생제의 항균력에 미치는 영향과 세포 내 세균 사멸효과 및 침투 저해효과에 대해 알아보고자 하였다.

본 연구에서는 Gardnerella vaginalis 세균주를 이용하여, 표준액체배지 희석법으로 MIC를 측정하고, 시간대별 균 성장 곡선에 미치는 영향을 평가하여, 加減攝營煎 물 추출물의 Gardnerella vaginalis에 대한 항균력을 평가하였으며, clindamycin과 加減攝營煎 물 추출물의 병용효과를 Checkboard microtiter assay 및 clindamycin (MIC, 1/2MIC, 1/4MIC)에 加減攝營煎 물 추출물의 MIC를 첨가한 병용물의 시간대별 균 성장 곡선에 미치는 영향을 이용하여 각각 평가하였다.

표준액체배지희석법에 의한 MIC 측정은 세균 및 다양한 감염증에 대한 후보물질의 항균활성을 측정하는 가장 기본적인 방법이다<sup>15)</sup>, Gardnerella vaginalis에 대한 clindamycin의 MIC는 10% CO<sub>2</sub> 조건하에서 대략 0.004 µg/ml로 알려져

있으며<sup>44)</sup>, 질염 유래 병원성 Gardnerella vaginalis 임상분리 균주에서는 대략 0.016~0.19 µg/ml로 알려져 있다<sup>45)</sup>. 본 실험의 결과에서도, 10% CO<sub>2</sub> 조건하에서 0.012±0.006 (0.004~0.016) µg/ml로 관찰되어, Muli, Altrichter 등의<sup>44,45)</sup> 연구들과 유사한 항균활성이 인정되었다. 또한 加減攝營煎 물 추출물의 MIC는 1.016±0.524 mg/ml로 관찰되어 미약하지만 Gardnerella vaginalis에 대한 항균활성을 나타내었다.

시간대별 균 성장 곡선에 미치는 영향 역시 세균 및 다양한 감염증에 대한 후보물질의 항균활성을 측정하는 가장 기본적인 방법으로<sup>17)</sup>, 본 실험의 결과 clindamycin 및 加減攝營煎 추출물은 MIC, MIC×2에서 각각 처리 용량 의존적인 시간대별 균 성장 억제를 나타내었고, 각각의 clindamycin 및 加減攝營煎 물 추출물 MIC 농도 단독 처리군에 비해 유의성 있는 생균 수의 감소가 clindamycin MIC+加減攝營煎 물 추출물 및 clindamycin 1/2 MIC+加減攝營煎 물 추출물 MIC 농도 병용 처리군에서 각각 배양 24시간 후부터 지속적으로 관찰되었으며, clindamycin 1/4 MIC+加減攝營煎 물 추출물 MIC 농도 병용 처리군에서는 加減攝營煎 물 추출물 MIC 농도 단독 처리군에 비해 유의성 있는 생균 수의 감소가 관찰되었으나 clindamycin MIC 농도 단독 처리군에 비해서 유의성 있는 생균 수의 변화는 모든 배양 시간대에서 인정되지 않았다. 따라서 加減攝營煎 물 추출물 병용은 clindamycin의 균 성장 억제에 대해 2배 정도의 유의성 있는 현저한 상승효과를 나타내었으므로, clindamycin의 사용량을 1/2 이상 줄일 수 있을 것으로 기대된다.

일반적으로 화학요법제인 항생제와 천

연추출물의 병용 효과는 Checkerboard microtiter assay법을 이용하여 평가되어 왔다<sup>46)</sup>. 본 실험에서 加減攝營煎 물 추출물과 clindamycin의 병용에 따른 효과를 관찰한 결과 FIC index는 0.544±0.231 (0.188~0.751)로 산출되어, 균 성장 저해 효과에서의 결과와 잘 일치되어 加減攝營煎 물 추출물과 clindamycin의 병용은 Gardnerella vaginalis에 대해 부분 상승작용이 있다고 본다.

대부분의 감염성 세균은 세포 표면의 부착 단백질인 adhesion과 상호작용하여 상피세포에 침투하며, Gardnerella vaginalis 역시 질 상피세포 내 부착 및 침투성이 상당히 우수하여, 숙주의 면역반응을 회피하여 macrophage와 같은 탐식세포에 의해 제거되지 않아 재발을 반복한다. 따라서, 상피세포 내 세균 침투 억제 효과와 탐식세포 내 사멸 증가효과를 관찰함으로써, 더욱 명확한 항균력을 알 수 있다. 본 실험에서 clindamycin 및 加減攝營煎 물 추출물은 상피세포 내 Gardnerella vaginalis 침투율 억제 및 탐식세포 내 사멸 증가효과 역시 각각 사람 정상 질상피세포 유래인 VK2세포와 murine macrophage 세포주인 264.7세포에서 관찰되었으며, 각각의 clindamycin 및 加減攝營煎 물 추출물 1/2 MIC 농도 단독 처리군에 비해 유의성 있는 상피세포 및 탐식세포 내 생균 수의 감소가 clindamycin 1/2 MIC+加減攝營煎 물 추출물 1/2 MIC 및 clindamycin 1/4 MIC+加減攝營煎 물 추출물 1/2 MIC 농도 처리군에서 각각 인정되었다.

이상의 실험 결과로 加減攝營煎 물 추출물은 Gardnerella vaginalis에 대해 비교적 낮은 항균력을 나타내었으나, 처리 용량 의존적인 시간대별 균 성장 억제를

나타내었고, clindamycin과의 병용시 각각의 단독 처리군에 비해 현저히 우수한 효과가 인정되었다. 또한, Checkerboard microtiter assay법을 이용한 결과 clindamycin과의 병용시 상승작용이 있는 것으로 관찰되었고, 상피 세포 내 Gardnerella vaginalis 침투율 억제 및 탐식 세포 내 사멸 증가 효과를 약 2배까지 유의성있게 증가시키는 것으로 관찰되어, clindamycin의 사용량을 대략 1/2 또는 그 이상 줄일 수 있을 것으로 기대되며 clindamycin의 과남용에 따른 부작용 및 내성을 줄일 수 있을 것으로 사료된다. 또한 추후 경구용으로 사용하는 대표적인 약물인 metronidazole과의 병용효과에 대한 연구도 필요할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

加減攝營煎 물 추출물의 Gardnerella vaginalis에 대한 항균력과 Clindamycin과의 병용효과를 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 加減攝營煎 물 추출물은 Gardnerella vaginalis에 대해 비교적 낮은 항균력을 나타내었으나, 용량 의존적인 시간대별 균 성장 억제 효과를 보였다.
2. 加減攝營煎 물 추출물은 clindamycin과의 병용시 각각의 단독 처리군보다 더욱 우수한 시간대별 균 성장 억제 효과를 나타내었다.
3. 加減攝營煎 물 추출물과 clindamycin 병용시 Checkerboard microtiter assay에서 FIC index가  $0.544 \pm 0.231$ 로 산출되어 부분 상승작용이 있는 것으로 관

찰되었다.

4. 加減攝營煎 물 추출물은 clindamycin과의 병용시 각각의 단독 처리군보다 유의성 있는 탐식세포 내 생균 수의 감소를 나타내었다.
5. 加減攝營煎 물 추출물은 clindamycin과의 병용시 각각의 단독 처리군보다 효과적인 상피세포 내 Gardnerella vaginalis 침투율 억제를 나타내었다.

□ 투 고 일 : 2014년 1월 21일

□ 심 사 일 : 2014년 2월 4일

□ 게재확정일 : 2014년 2월 10일

## 참고문헌

1. Aroutcheva AA, et al. Gardnerella vaginalis isolated from patients with bacterial vaginosis and from patients with healthy vaginal ecosystems. Clin Infect Dis. 2001;33(7):1022-7.
2. 한방여성의학 편찬위원회. 한방여성의학. 서울:정담. 2007:282-93.
3. 대한산부인과학회. 부인과학. 서울:고려의학. 1987:147-9.
4. Hauth JC, et al. Reduced incidence of preterm delivery with metronidazole and erythromycin in women with bacterial vaginosis. N Engl J Med. 1995;333(26):1732-6.
5. Mayaud R. Tackling bacterial vaginosis in developing countries. Lancet. 1997;350:530-1.
6. Hillier SL. Clindamycin treatment of bacterial vaginosis. Rev Contemp Pharmacother. 1992;3:263-8.

7. 조성남, 질염. 대한산부인과학회 연수 강좌. 2004;33:77-85.
8. Thomas C, et al. Antibiotics and hospital-acquired Clostridium difficile-associated diarrhoea: a systematic review. J Antimicrob Chemother. 2003; 51(6):1339-50.
9. 김연희, 이홍식. Gardnerella vaginalis에 대한 항약제의 항균활성. 한국미생물·생명공학회지. 2006;34(1):70-3.
10. 葛洪. 肘後備急方. 北京:人民衛生出版社. 1996:108.
11. 김영훈. 청강의감. 서울:정보사. 2001:387-9.
12. 조형래 등. 청강의감 부인과 질환 및 수재 처방에 대한 연구. 대한한방부인과학회지. 2000;13(2):295-325.
13. Pfaller MA, et al. Standardized susceptibility testing of fluconazole: an international collaborative study. Antimicrob Agents Chemother. 1992; 36(9):1805-9.
14. Pfaller MA, et al. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. Antimicrob Agents Chemother. 1990;34(9):1648-54.
15. Tenover FC, et al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. J Clin Microbiol. 1998;36(4):1020-7.
16. Pfaller MA, et al. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. J Clin Microbiol. 1988; 26(8):1437-41.
17. Janssen AM, Scheffer JJ, Baerheim Svendsen A. Antimicrobial activity of essential oils: 1976-86 literature review. Aspects of the test methods. Planta Med. 1987;53(5):395-8.
18. Isenberg HD. Synergism testing: Broth microdilution checkerboard and broth macrodilution methods. In: Clin Microbiol procedure manual. Washington, DC:American Society for Microbiology. 1992:1-28.
19. 윤정숙, 문희원, 이미애. 다제내성 Pseudomonas aeruginosa 균주의 항균제 병합효과. 대한임상미생물학회지. 2006;9(1):1-6.
20. Cuffini, et al. Enhanced Staphylococcus aureus susceptibility to immune-defense induced by subinhibitory and bactericidal concentration of imipenem. J Antimicrob Chemotherp. 1993;31(4):559-68.
21. Almeida, et al. Staphylococcus aureus invasion of bovine mammary epithelial cells. J Dairy Sci. 1996;79(6):1021-6.
22. Hay PE. Therapy of bacterial vaginosis. J Antimicrob Chemother. 1998;41(1):6-9.
23. Bannatyne RM, Smith AM. Recurrent bacterial vaginosis and metronidazole resistance in Gardnerella vaginalis. Sex Transm Infect. 1998;74(6):455-6.
24. Daum RS. Clinical practice. Skin and soft-tissue infections caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus. N Engl J Med. 2007;357(4):380-90.
25. Starr J. Clostridium difficile associated diarrhoea: diagnosis and treatment. BMJ. 2005;331(7515):498-501.
26. Ajantha GS, et al. Phenotypic detection of inducible clindamycin resistance

- among *Staphylococcus aureus* isolates by using the lower limit of recommended inter-disk distance. *Indian J Pathol Microbiol.* 2008;51(3):376-8.
27. 黃度淵. 醫宗損益. 서울:여강출판사. 1993:50-93.
  28. 성현아, 박영선, 김동철. 蛇床子洗方の *Gardnerella vaginalis*에 대한 시험관내 항균력 및 Metronidazol과 병용효과. *대한한방부인과학회지.* 2010;23(2):20-37.
  29. 권지명, 김동철. 淸帶湯의 *Gardnerella vaginalis*에 대한 시험관내 항균력 및 Clindamycin의 병용효과. *대한한방부인과학회지.* 2011;24(2):1-12.
  30. 이승혜, 김동철. 완대탕의 *Gardnerella vaginalis*에 대한 시험관내 항균력 및 Clindamycin의 병용효과. *대한한방부인과학회지.* 2012;25(1):34-46.
  31. 한영실, 전희정, 황재선. 백작약으로부터 식품부패 미생물에 대한 항균성 물질의 분리 및 동정. *한국조리과학회지.* 2000;16(5):67-74.
  32. 최은영 등. 백출 추출물의 세포독성과 항균효과검색. *동의생리병리학회지.* 2002;16(2):348-52.
  33. Kum EJ, et al. Antifungal activity of phenanthrene derivatives from aerial bulbils of *dioscorea batatas* decne. *J Life Sci.* 2006;16(4):647-52.
  34. 김현정 등. 숙단추출물의 첨가로 인한 양념 돈육의 품질특성 및 저장성 향상. *한국식품영양과학회지.* 2011;40(1):102-9.
  35. 정동선, 이나현. 천궁(*Cnidium officinale* Makino) 지상부(잎과 줄기) 추출물의 항균활성. *한국미생물생명공학회지.* 2007;35(1):30-5.
  36. 임성민, 이동녕, 김형준. 질염에 대한 가자, 차전자, 천궁, 포공영, 황금의 효과. *대한한방부인과학회지.* 2004;17(4):34-45.
  37. 유시용 등. 당귀와 백지로부터 분리한 Coumarin계 물질들의 식물병원균에 대한 항균활성. *한국농약과학회지.* 2001;5(3):26-35.
  38. 윤경원, 최성규. 당귀 속 2종 식물의 항균활성. *한국자연식물학회지.* 2004;17(3):278-82.
  39. Fukai T, et al. Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia.* 2002;73(6):536-9.
  40. He J, et al. Antibacterial compounds from *Glycyrrhiza uralensis*. *J Nat Prod.* 2006;69(1):121-4.
  41. Yang C, et al. Determination of glycyrrhizic acid in different decoctions of sanaotang by HPLC and comparison with antifungal effects in vitro. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2007;32(11):1031-4.
  42. Braga LC, et al. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. 2005;51(7):541-7.
  43. Choi JG, et al. In vitro activity of methl gallate isolated from *Gallarhois* alone and in combination with ciprofloxacin against clinical isolates of salmonella. *J Microbiol Biotechnol.* 2008;18(11):1848-52.
  44. Shahverdi AR, et al. Galbanic acid from *Ferulaszowitsiana* enhanced the antibacterial activity of penicillin G and cephalexin against *Staphylococcus*

- aureus. Biol Pharm Bull. 2007;30(9):1805-7.
45. Muli F, Struthers JK. Use of a continuous-culture biofilm system to study the antimicrobial susceptibilities of Gardnerella vaginalis and Lactobacillus acidophilus. Antimicrob Agents Chemother. 1998;42(6):1428-32.
46. Zhang L, et al. High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104(11):4606-11.